Internationales Büro INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

WO 00/25839 (51) Internationale Patentklassifikation 7 : (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: A1 A61L 27/36 (43) Internationales 11. Mai 2000 (11.05.00) Veröffentlichungsdatum: (81) Bestimmungsstaaten: CA, CZ, IL, KR, NO, TR, US, ZA, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, PCT/EP99/08056 (21) Internationales Aktenzeichen: FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). (22) Internationales Anmeldedatum: 25. Oktober 1999 (25.10.99) Veröffentlicht (30) Prioritätsdaten: Mit internationalem Recherchenbericht. DE 29. Oktober 1998 (29.10.98) 198 49 984.1 (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): TU-TOGEN MEDICAL GMBH [DE/DE]; Industriestrasse 6, D-91077 Neunkirchen am Brand (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KÜBLER, Norbert [DE/DE];

(54) Title: METHOD FOR PREPARING BONE MATERIAL

Auf der Schanz 62, D-97076 Würzburg (DE). (74) Anwalt: MANITZ, FINSTERWALD & PARTNER GBR; Postfach 22 16 11, D-80506 München (DE).

- (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR PRÄPARATION VON KNOCHENMATERIAL
- (57) Abstract

The invention relates to a method for preparing bone material. According to said method, the demineralized bone material is subjected to an autolytic decomposition and an extraction of its cellular components while at the same time its osteoinductive matrix proteins are maintained. To this end, the bone material is incubated in a phosphate buffer solution in combination with a mixture of enzyme inhibitors. The dwelling time in the buffer solution does not exceed 24 hours.

(57) Zusammenfassung

Bei einem Verfahren zur Präparation von Knochenmaterial wird das demineralisierte Knochenmaterial einem autolytischen Abbau sowie einer Extraktion seiner zellulären Komponenten unterworfen unter gleichzeitiger Erhaltung seiner osteoinduktiven Matrixproteine. Dies wird durch Inkubation in einer Phosphatpufferlösug in Kombination mit einer Mischung aus Enzyminhibitoren erreicht, wobei die Verweilzeit in der Pufferlösung 24 Stunden nicht überschreitet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

	AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
	AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
	AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg .	SN	Senegal
	ΑU	Australien	. GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
	AZ	Ascrbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Моласо	TD	Tschad
	BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
	BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
	BE	Belgien	GN	Gninea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
	BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
	BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
	BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
	BR	Brasilica	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
	BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
	CA	Kanada	ΙT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
	CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
	CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
	CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU ·	Jugoslawien
	CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
	CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
	CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
	CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumānien		
	cz	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
	DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
ı	DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
į	EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

WO 00/25839 PCT/EP99/08056

Verfahren zur Präparation von Knochenmaterial

5

Die Erfindung bezieht sich auf die Präparation und Gewinnung von demineralisiertem Knochenmaterial, das zur Wiederherstellung bei knöchernen Defekten in der Chirurgie geeignet ist.

10

15

25

Die Verwendbarkeit demineralisierten Knochenmaterials ist bereits bekannt. 1965 beschrieb M. R. Urist das osteoinduktive Potential von demineralisiertem Knochen nach intramuskulärer Implantation im Tierexperiment. Dieses Knochenmaterial enthält eine oder mehrere osteoinduktiv wirksame Substanzen wie z.B. die sogenannten bone morphogenetic proteins (BMPs), die eine Knochenregeneration in einem knöchernen Defekt stimulieren können (Lit. Urist, M.R.: Bone Formation by Autoinduction. Science 150: 893,1965.).

20 Eine Verbesserung dieses osteoinduktiven Knochenmaterials wurde über die Jahre hinweg schrittweise erreicht. Durch die Erkenntnis, daß eine im phosphatgepufferten Medium geführte Aktivierung von endogenen Kno-

phosphatgepufferten Medium geführte Aktivierung von endogenen Knochenenzymen, die einen Abbau von osteoinduktiven Proteinen bewirken, durch verschiedene Enzyminhibitoren wie Natriumazid, Jodessigsäure, Jodacetamid, N-Ethylmaleinimid, Phenylmethyl-sulfonylfluorid und p-Chlorquecksilberbenzoat, unterdrückt werden kann, ohne gleichzeitig die Autolyse von Knochenzellen zu beeinträchtigen, führte schließlich zu einem speziellen Herstellungsverfahren, mit dem ein sogenannter AAA-

Knochen, ein autolysierter, Antigen extrahierter, allogener Knochen, präpariert werden konnte (vgl. Kübler N., et al., J.Oral Maxillofac. Surg., 51: 1346-1357, 1993.). Dieser AAA-Knochen hat bei gleichzeitig reduzierter Allo-Antigenität osteoinduktive Eigenschaften. Die Reduzierung der antigenen Eigenschaften wird durch Behandlung der zellulären Bestandteile durch Autolyse sowie deren Extraktion mit Chloroform-Methanol erreicht. Hierbei wird Knochenmaterial, das einem Verfahren zur Herstellung als AAA-Knochen unterzogen wird, aus Verstorbenen gewonnen.

Die Gewinnung des Ausgangsmaterials für das demineralisierte Kno-10 chenmaterial aus Verstorbenen ist durch den Einfluß von nach dem Tode einsetzenden Zersetzungsvorgängen beschränkt. Diese Autolyse setzt unmittelbar post mortem ein und zerstört die für die beabsichtigte Wirkung des Ersatzmaterials erforderlichen Wirksubstanzen im entnommenen Knochen. Eine Gewinnung von geeignetem Knochen ist damit bislang nur 15 unmittelbar bzw. wenige Stunden post mortem möglich, wie z.B. aus Multiorganspendern. Die Zahl an Multiorganspendern ist sehr gering und erlaubt keine Gewinnung von Ausgangsmaterial für Material im Sinne der Erfindung mit dem Zwecke einer zuverlässigen und gesicherten Versorgung von Chirurgen. Andere Verstorbene kommen darüber hinaus als 20 Spender praktisch nicht in Frage, da das Einholen einer Erlaubnis zur Gewebeentnahme innerhalb des kurzen Zeitfensters für eine Gewebeentnahme nicht möglich ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Konzentration und die Wirksamkeit der das Knochenwachstum stimulierenden Substanzen unter bestimmten Umständen bis zu 24 Stunden post 25 mortem erhalten bleibt und dadurch eine Entnahme sowohl aus hirntoten Spendern wie aus normal Verstorbenen möglich ist.

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein verbessertes Verfahren zur Präparation von Knochenmaterial zu schaffen, das den Heilungsprozeß nach einer Implantation beschleunigt.

- Die Lösung dieser Aufgabe erfolgt durch die Merkmale des Anspruchs 1
 und insbesondere dadurch, daß die Verweilzeit des Knochenmaterials in
 der Pufferlösung 24 Stunden nicht überschreitet. Überraschenderweise
 hat sich nämlich herausgestellt, daß die bislang als vorteilhaft angesehene
 Verweilzeit von 72 Stunden weder erforderlich noch vorteilhaft ist, um das
 Knochenmaterial zu präparieren und um die für den Heilungsprozeß wesentlichen BMPs zu erhalten. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird
 die Verträglichkeit des Knochenmaterials im lebenden Gewebe des Empfängers des Knochenimplantates verbessert und die Wirksamkeit bzw.
 Freisetzung der im knöchernen Träger enthaltenen Substanzen, die eine
 Knochenregeneration in einem Knochendefekt stimulieren können, werden
 verbessert, wodurch eine beschleunigte Heilung erreicht wird.
 - Erfindungsgemäß bleibt die natürlichen Knochensubstanz als Träger der Wirkstoffe und als Gerüstsubstanz zum biomechanisch korrekten Einbau weitgehend erhalten. Die vorliegende Erfindung verbessert die Behandlung des Leichenknochens jedoch derart, daß bestimmte Behandlungsschritte verkürzt und damit der Zeitverlauf des Abbaus der biologisch aktiven Inhaltsstoffe im Knochen vermindert werden.
- 25 Erfindungsgemäß besitzen die das Knochenwachstum stimulierenden, natürlichen Substanzen, die aus der Gerüstsubstanz des erfindungsgemäß behandelten Knochens erhalten werden, eine erhöhte Wirksamkeit gegenüber dem bisherigen Verfahren. Der Nachweis der verbesserten

Wirksamkeit erfolgt durch eine Implantationstest mit Ratten. Die Implantation des erfindungsgemäß behandelten Knochens in die Muskulatur von Ratten führt zur Erzeugung von Knochen- und Knorpelvorläuferzellen sowie zur Bildung von ausdifferenzierten Knochen- und Knorpelzellen. Die Bildung dieser Zellen ist semi-quantitativ auswertbar und ist durch die Menge bzw. durch den zeitlichen Anstieg der alkalischen Phosphataseaktivität ein Maß für die Aktivität der biologischen Inhaltsstoffe.

Weiter bleibt erfindungsgemäß die natürliche Knochensubstanz erhalten, die vom Empfängerorganismus als verträglich erkannt wird und im Verlaufe der Einheilung in körpereigenes Gewebe umgebaut wird. Ein wesentliches Element der Erfindung besteht dabei darin, daß die Chemikalien zur Bearbeitung des Ausgangsmaterials biologisch nicht stören und die Einheilung nicht behindern.

15

20

25

10

Gemäß der Erfindung bewirken die eingesetzten Chemikalien zur Demineralisierung der Gerüstsubstanz und zur Extraktion der zellulären Bestandteile gleichzeitig eine chemische Sterilisation, so daß eine akzidentelle Kontamination des Knochens durch Mikroben, entstanden im Verlaufe der Knochenentnahme oder während des Herstellungsverfahrens, durch das Behandlungsverfahren selbst beseitigt wird. Die Gewinnung des Knochens aus dem Leichenspender innerhalb einer 24-stündigen Frist erfolgt unter aseptischen Bedingungen. Damit kann eine Verkeimung durch Sporen im Spendergewebe ausgeschlossen werden. Eine Verkeimung durch vegetative Keime, wie sie in einem nachfolgenden Bearbeitungsverfahren zufällig oder durch nicht steril / aseptisch geführte Arbeitsgänge erfolgen kann, wird durch die verfahrensgemäße Anwendung der eingesetzten Chemikalien beseitigt. Eine terminale Sterilisation wie

z.B. durch Hitze oder Gas, wie sie zur Herstellung anderer pharmazeutischer Produkte eingesetzt wird, ist nicht obligatorisch, so daß die Inhaltsstoffe des demineralisierten Knochens vollständig erhalten werden können.

5

20

25

Vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung sind in der Beschreibung und in den Unteransprüchen beschrieben.

So beträgt bei einer ersten vorteilhaften Variante des erfindungsgemäßen
Verfahrens die Verweilzeit nicht mehr als 10 Stunden, vorzugsweise etwa
6 Stunden. Durch eine solche, im Vergleich zum Stand der Technik drastisch reduzierte Verweilzeit in der Pufferlösung wird die biologische Aktivität des erhaltenen Knochenmaterials deutlich gesteigert, ohne daß es jedoch erforderlich oder vorteilhaft wäre, eine erhöhte Konzentration an
Enzyminhibitoren zuzugeben.

Auch ist es vorteilhaft, wenn der Demineralisierung eine Entfettung vorausgeht. Hierbei ist jedoch eine Mischung aus Chloroform und Methanol als verwendetes Lösungsmittel physiologisch bedenklich, da bereits geringe Rückstände das Einheilungsverhalten beeinträchtigen können und darüber hinaus die Verwendungsmöglichkeit von Chloroform in einem pharmazeutischem Herstellungsverfahren aus arbeitsschutzrechtlichen Gründen mit erheblichen Beschränkungen verbunden ist. Der Ersatz des vorbekannten Entfettungsmittelgemisches Chloroform / Methanol durch andere Entfettungsmittel, z.B. Methanol allein, Chloroform allein, Ethanol, Äther, Azeton und andere Niedrigsieder und Gemische daraus bevorzugt Äther, ermöglicht eine verbesserte, rückstandsfreie Entfernung aus dem

20

25

Knochengewebe und eine verbesserte Verträglichkeit des Knochenersatzmaterials.

Besonders vorteilhaft ist es ferner, wenn das erhaltene Knochenmaterial am Ende der Prozeßfolge einer Gamma-Sterilisation unterworfen wird, da hierdurch ohne Einfluß auf die biologische Aktivität eine Sterilisierung des Materials erfolgen kann.

Nachfolgend wird die vorliegende Erfindung beispielhaft anhand einer vorteilhaften Ausführungsvariante beschrieben.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Präparation von Knochenmaterial sowie der Herstellung von knöchernen Defekten in der Chirurgie wird zunächst humaner, kortikaler Knochen, z.B. vom Femur, Tibia, Humerus oder kortikaler Knochen des Beckenkamms sowie des Craniums von geeigneten Spendern unter sterilen Bedingungen innerhalb von 6 Stunden post mortem und bei -80°C gelagert. Der gefrorene Knochen wird zur Bearbeitung in sterilem Wasser mit 2 mmol/l Natriumazid aufgetaut. Das Natriumazid dient als Enzyminhibitor um einen Abbau der osteoinduktiven Knochenmatrixproteine zu unterbinden. Die Knochenenden bzw. Gelenkansätze werden entfernt und der Knochen wird befreit von anhaftendem, nicht ossärem Gewebe und eventuell vorhandenes Knochenmark wird entfernt. Für Zwischenlagerungen während dieses Vorgangs wird der Knochen in destilliertem Wasser mit 2 mmol/l Natriumazid, 2 mmol/l N-Ethylmaleinimid und 0,1 mmol/l Benzamidin-Hydrochlorid bei 4°C gelagert und auf diese Weise eine enzymatische Aktivität unterbunden. Alternativ kann die Lagerung beispielsweise auch in 10 mmol/l Natriumazid und 3mmol/l N- Ethylmaleinimid bei 4°C erfolgen.

25

Anschließend erfolgt eine Entfettung in einem Chloroform/Methanol-Gemisch (1:1) bei Raumtemperatur über etwa 4 Stunden.

Nach einer Verdampfungszeit (Evaporierungszeitraum) von etwa 1 Stunde wird der Knochen zur Demineralisation in 0,6 mol/l Salzsäure bei 4°C eingelegt. Der Grad der Demineralisation ist abhängig von der Zeitdauer und dem Verhältnis zwischen dem mineralischen Gewicht und dem Volumen der Salzsäure. Dauer der Salzsäurebehandlung und damit Grad der Demineralisation liegen zwischen wenigen Stunden für eine Oberflächendemineralisierung und bis zu 30 Stunden für eine vollständige Demineralisation. Dabei löst die Salzsäure auch säurelösliche Proteine heraus wie Knochen-Sialoprotein, Osteopontin, Osteonectin, Osteocalcin, und Thrombospondin. Die Behandlung mit Salzsäure ermöglicht die Diffusion der BMPs in das Empfängergewebe post implantauonem und erleichtert Osteoinduktion und Resorption durch Makrophagen und Osteoklasten.

Nach der Demineralisation wird der Knochen erneut einer Säuberung auf eventuelle Gewebereste auf der Knochenoberseite unterzogen und in sterilem, destilliertem Wasser bei 4°C für 30 - 60 Minuten gewaschen. Durch Inkubation in 0,1 mol/l Phosphat-Puffer, pH 7,4, mit 3 mmol/l N-Ethylmaleinimid und 10 mmol/l Natriumazid zur Erhaltung der osteoinduktiven Matrixproteine wird ein autolytischer Abbau der Knochenzellen durchgeführt. Die Behandlung erfolgt bei 37°C unter Schütteln über etwa 6 Stunden in einem Wasserbad. Ein Wechsel der Pufferlösung kann erfolgen. Anschließend wird der Knochen in sterilem, deionisiertem Wasser für 2 bis 4 Stunden bei 4°C gerührt. Das Wasser wird für diesen Vorgang zweimal gewechselt.

Es folgt eine Schrumpfung der Kollagenfibrillen und die Extraktion hochmolekularer Proteoglykane mittels 6 mol/l Lithiumchlorid sowie die Extraktion von Protein-Polysacchariden mit geringem Molekulargewicht wie Biglykanen, Dekorin, Fibromodulin etc. durch 0,3 mol/l Calciumchlorid. Die Lösung enthält 3 mmol/l Natriumazid und die Extraktion wird über 24 Stunden bei 4°C durchgeführt.

Der Knochen wird anschließend in sterilem destillierten Wasser für 12 Stunden bei 4°C gewaschen, wobei ein mehrfacher Wasserwechsel durchgeführt wird. Lipide sowie Lipoproteine der Zellmembran werden über 24 Stunden mittels einer 1:1 Mischung aus Chloroform-Methanol extrahiert. Ein zusätzlicher Effekt dieser Behandlung besteht in der Inhibition sowie Extraktion endogener, BMPs abbauender Enzyme. Nach Abgießen der Chloroform-Methanollösung wird der Knochen unter sterilen Bedingungen getrocknet. Schließlich wird der Knochen wiederum mit sterilem, deionisierten Wasser für 4 Stunden bei 4°C gewaschen und anschließend tiefgefroren und danach für 10 Tage lyophilisiert und schließlich steril verpackt. Hieran kann sich noch eine Gamma-Sterilisation anschließen.

20

25

15

10

In Stichworten gestaltet sich das erfindungsgemäße Herstellungsverfahren für Knochenstücke wie folgt:

- Bei -80°C tiefgefroren gelagerten Knochen in Aqua dest. mit 2,0 mM Natriumazid auftauen.
 - 2 Knochenenden entfernen.
 - 3 Knochen von Weichgeweben befreien.
 - 4 Knochenstücke mittels Kürette von Knochenmark befreien.

- 5 Knochen in gewünschte Größe sägen.
- Knochen mit starkem, kaltem Wasserstrahl von Knochenmark befreien, Knochen nicht austrocknen lassen, in Aqua dest, 4°C, mit 2,0 mM Natriumazid 2,0 mM N-Ethylmaleinimid und 0,1 mM
- 5 Benzamidin-HCl lagern.

- 7 Entfetten durch ein Bad in Chloroform/Methanol 1:1 bei RT, 4 h.
- 8 Evaporieren für ca 1 h.
- Demineralisierung mit 0,6 M HCl bei 4°C für 2 bis 16 h je nach gewünschtem Demineralisierungsgrad (am nächsten Tag Röntgenkontrolle).
- Oberste Schicht des demineralisierten Knochens und noch anhaftendes Weichgewebe entfernen.
- 11 Waschen mit Aqua dest. bei 4°C für 1 h.
- Knochen für 6 h in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 mit 3,0 mM Nethylmaleinimid und 10,0 mM Natriumazid bei 37°C im Wasserbad inkubieren.
 - Mit Aqua dest, für 2-4 h bei 4°C waschen und das Aqua dest. zweimal wechseln.
- 14 Für 24 Std mit 6.0 M LiCl/0,3 M CaCl₂ mit 3,0 mM Natriumazid bei 4°C inkubieren.
 - 15 Mit Aqua dest. 12 bis 24 h bei 4°C waschen und das Aqua dest. mindestens zweimal wechseln.
 - Abtöten von Keimen und Sporen durch Desinfektion bzw. Chemo-Sterilisation sowie Extraktion zellulärer Abbauprodukte mittels Chloroform/Methanol (1:1) bei Raumtemperatur für 24 h.
 - 17 Evaporieren für ca. 2-3 h.
 - Mit sterilem Aqua dest. für 4 h bei 4 °C waschen, das Wasser zweimal wechseln.

- 19 Lyophilisieren für 10 Tage; anschliessend Sterilproben prüfen.
- 20 Knochenstücke steril verpacken.
- 21 Eventuell Sterilisierung mittels Gamma-Sterilisation bei 3 MRad.
- 5 Es sei darauf hingewiesen, daß die oben genannten Schritte 10 bis 18 grundsätzlich in ihrer Reihenfolge vertauscht werden können.

Ein Herstellungsverfahren für Knochenpulver gestaltet sich gemäß der Erfindung wie folgt:

- 1 Knochen in Aqua dest. Mit 2,0 mM Natriumazid (0,13 g auf 1 l) auftauen.
- 2. Knochen von Weichgewebe befreien.
- 3 Knochen in kleine Stücke sägen.
- 15 4 Knochenstücke von Knochenmark befreien und unter kaltem Wasser nochmals säubern.
 - 5 Knochen nicht austrocknen lassen, in Aqua dest, 4°C, mit 10,0 mM Natriumazid 3,0 mM N-Ethylmaleinimid lagern.
- 6 Mit der Knochenmühle unter Verwendung von flüssigem Stickstoff 20 grob mahlen (ca. 2,0 mm Korngröße).
 - 7 Entfetten durch ein Bad in Chloroform/Methanol 1:1 bei RT, für 1 bis 4 h.
 - 8 Evaporieren für ca 1 h.
- 9 Auf die gewünschte Größe (ca 0,5 mm Korngröße) mahlen unter 25 Kühlung, z.B. durch flüssigen Stickstoff.
 - Demineralisierung mit 0.6 N HCl bei 4°C über Nacht (am nächsten Tag Röntgenkontrolle).
 - 11 Waschen mit Aqua dest. bei 4° C für 1 h.

10

20

- Pulver für 6 Stunden in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 mit 3,0 mM N-ethylmaleinimid und 10,0 mM Natriumazid bei 37° C im Wasserbad inkubieren.
- 13 Mit Aqua dest. 10 mM Natriumazid und 3,0 mM N-Ethylmaleinimid für 4 h bei 4°C waschen und das Aqua dest. zweimal wechseln.
 - Für 24 h mit 6,0 M LiCl /0,3 M CaCl₂ mit 3,0 mM Natriumazid bei 4°C inkubieren.
- Mit Aqua dest. 10 mM Natriumazid und 3,0 mM N-Ethylmaleinimid den ganzen Tag bei 4°C waschen und Aqua dest. mindestens zweimal wechseln.
- Abtöten von Keimen und Sporen durch Desinfektion bzw. Chemo-Sterilisation sowie Extraktion zellulärer Abbauprodukte mittels Chloroform/Methanol (1:1) bei Raumtemperatur für 24 h.
- 17 Evaporieren für ca 1 h.
- 15 18 Mit sterilem Aqua dest. für 1 h bei 4° C waschen.
 - 19 Lyophilisieren.
 - 20 Nach 10 Tagen Sterilproben prüfen.
 - 21 Pulver steril verpacken.
 - 22 Eventuell Sterilisierung mittels Gamma-Sterilisation bei 3 MRad.

Auch hier sind die oben genannten Schritte 11 bis 18 grundsätzlich in ihrer Reihenfolge vertauschbar.

Die nachfolgenden Tabellen zeigen den Einfluß verschiedener Verfah-25 rensparameter auf die Osteoblastenaktivität (alkalische Phosphatase (AP)).

Tabelle 1A zeigt die Abhängigkeit der Osteoblastenaktivität (alkalische Phosphataseaktivität (AP)) nach 10- bzw. 15- tägiger Implantation sowie

der osteoinduktiven Potenz nach 4-wöchiger heterotroper, d.h. intramuskulärer Implantation in Ratten von der Expositionsdauer des AAA-Knochens gegenüber Phosphatpuffer in Kombination mit den genannten Enzyminhibitoren (3,0 mmol/l N-Ethylmaleinimid und 10 mmol/l Natriumazid bei 37°C) während der Autolyse:

rabelle 1A

			· ·	1	T	Γ	<u></u>
	Histologie /	Osteoinduktion	2/6	3/4	4/6	9/9	2/6
	AP (U) 15 Tage	$\overline{X} \pm SD(n)$	$68.4 \pm 4.9 (5)$	76.0 ± 9.9 (6)	28.3 ± 6.8 (6)	12.2 ± 3.1 (6)	7.5 ± 2.6 (6)
	AP (U) 10 Tage	$\overline{X} \pm SD (n)$	41.4 ± 5.7 (6)	1	22.5 ±4,9 (6)	14.6 ± 3.5 (6)	5.5 ± 1.2 (6)
Einwirkzeit (Std.)	von 0,1 mol/1	Na-Phosphat, pH 7,4	-	. 9	24	72	168

Wie Tabelle 1A zeigt, wirkt sich eine über 6 Stunden hinausgehende Einwirkzeit in der Phosphatpufferlösung nicht vorteilhaft auf die Osteoblastenaktivität aus. Zudem kann durch eine Verringerung der bislang gewählten Einwirkzeit von 72 Stunden auf 6 Stunden eine Steigerung der Osteoblastenaktivität auf das über 6-fache erzielt werden (nach 15-tägiger Implantation).

Tabelle 1B zeigt die Abhängigkeit der Osteoblastenaktivität (alkalische Phosphatase (AP)) nach 10- bzw. 15-tägiger Implantation sowie der osteo-induktiven Potenz nach 4- wöchiger heterotroper, d.h. intramuskulärer Implantation in Ratten von der Expositionsdauer des AAA-Knochens gegenüber der neutralen Phosphatpufferlösung in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen an Enzyminhibitoren:

Osteoinduktion Histologie 9/9 2/3 0.8 (5) 4.9 (5) 5.8 (5) 1.2 (6) 0.6 (6) 47.3 ± 23.1 (5) $13.7 \pm 1.9 (6)$ 71.8 ± 13.1 (4) $7.5 \pm 2.6 (6)$ $28.3 \pm 6.8 (6)$ $12.2 \pm 3.1 (6)$ AP (U) 15 Tage $76.0 \pm 9.9 (6)$ $\overline{X} \pm SD (n)$ + 20.3 ± 22.5 ± 6.5 ± + 8.3 AP (U) 10 Tage 22,5 ±4.9 (5) 14,6 ±3,5 (6) $5.5 \pm 1,2 (5)$ $\overline{X} \pm SD (n)$ Phosphat, pH 7,4 Einwirkzeit (Std) 0,1 mol/1 Na-168 168 24 24. 9 2 9 100 mmol/l Natriumazid 1000 mmol/l Natriuma-10 mmol/l Natriumazid N-ethylmaleinimid N-ethylmaleinimid N-ethylmaleinimid Enzyminhibitoren Konzentration 300 mmol/l 30 mmol/1 3 mmol/l zid

Tabelle 1B

Wie Tabelle 1B zeigt, wird die Osteoblastenaktivität durch eine erhöhte Konzentration an Enzyminhibitoren während der Autolyse in neutraler Phosphatpufferlösung nicht gesteigert. Auch wirkt sich eine über 6 Stunden hinausgehende Einwirkzeit in der Phosphatpufferlösung nicht positiv auf die Osteoblastenaktivität (nach 15-tägiger Implantation) aus.

Tabelle 2 zeigt den Einfluß von Lösungsmittelgemischen, eingesetzt zur Entfettung und Chemosterilisation, auf die Osteoblastenaktivität (alkalische Phosphatase (AP) und Osteoinduktion) nach 4-wöchiger heterotroper, d.h. intramuskulärer Implantation in Ratten sowie der Chondroinduktion nach 14-tägiger Einwirkung auf neonatale Rattenmuskulatur in vitro:

Tabelle 2

Chemosterilisation 24 h			
mit 50% Methanol und	AP (U) 10 Tage	Histologie	
20%	$\overline{X} \pm SD(n)$	Osteoinduktion	Chondroinduktion in vitro
Chloroform	55.9 ±24.8 (6)	12/15	4/6
Aceton	10.3 ±2.8 (6)	12/22	1/3
Äther	18.2 ±4.7 (5)	11/16	8/8

WO 00/25839 PCT/EP99/08056

20 Ansprüche

- Verfahren zur Präparation von Knochenmaterial zur Wiederherstellung von knöchernen Defekten in der Chirurgie, umfassend folgende Schritte:
 - Demineralisieren von vorzugsweise kortikalem Knochenmaterial,

5

10

15

20

autolytischer Abbau der Knochenzellen des
demineralisierten Knochenmaterials unter Erhaltung der
osteoinduktiven Matrixproteine durch Waschen in einer
Phosphatpufferlösung unter Zuführung von Enzyminhibitoren,

dadurch gekennzeichnet, daß die Verweilzeit in der Pufferlösung 24 Stunden nicht überschreitet.

- Verfahren nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 die Verweilzeit nicht mehr als etwa 10 Stunden, vorzugsweise etwa 6 Stunden beträgt.
- Verfahren nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 der Demineralisierung eine Entfettung, vorzugsweise unter Verwendung einer Methanolmischung, vorausgeht.
 - Verfahren nach Anspruch 1,dadurch gekennzeichnet, daßsich an die Demineralisierung eine Chemosterilisation, vor-

zugsweise unter Verwendung einer Methanolmischung, anschließt.

- Verfahren nach Anspruch 3 oder 4,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 die Methanolmischung neben Methanol Äther oder Chloroform
 aufweist.
- Verfahren nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet, daß

 das erhaltene Knochenmaterial einer Gamma-Sterilisation unterworfen wird.
- Verfahren nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 das Knochenmaterial vor der Demineralisierung unter Verwendung von flüssigem Stickstoff zu Pulver gemahlen wird.
- 8. Verfahren nach Anspruch 1,
 20 dadurch gekennzeich net, daß
 das Knochenmaterial vor der Demineralisierung ohne Erhitzung
 über 40°C zu Pulver gemahlen wird.
- 5. Knochenmaterial, erhältlich durch ein Verfahren nach
 zumindest einem der vorstehenden Ansprüche.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter anal Application No PCT/EP 99/08056

A. CLASSII IPC 7	FICATION OF SUBJECT MATTER A61L27/36			
According to	o International Patent Classification (IPC) or to both national classif	fication and IPC		
	SEARCHED			
Minimum do IPC 7	ocumentation searched (classification system followed by classification $A61L$	ation symbols)		
	tion searched other than minimum documentation to the extent tha			
Electronic d	ata base consulted during the international search (name of data I	base and, where practical, search terms used)	
	•	•	•	
Ì		·		
C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the	relevant passages	Relevant to claim No.	
х	US 5 112 354 A (SIRES BRYAN S) 12 May 1992 (1992-05-12)		1-5,9	
Υ	column 1, line 30 - line 48		6-8	
	column 5, line 34 -column 6, lir	ne 55		
γ	WO 96 39203 A (BIOCOLL LAB INC)		6	
	12 December 1996 (1996-12-12)			
l '	page 1, line 17 - line 31 page 23, line 32 -page 24, line	6		
Y	US 4 472 840 A (JEFFERIES STEVE)	V R)	7,8	
	25 September 1984 (1984-09-25) column 2, line 38 - line 68			
	example 1			
		-/		
	,			
	·			
X Funt	her documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family members are listed	in annex.	
° Special ca	ategories of cited documents:	"T" later document published after the linte	mational filing date	
"A" docum	ent defining the general state of the art-which is not dered to be of particular relevance	or priority date and not in conflict with cited to understand the principle or the	the application but eory underlying the	
"E" earlier	document but published on or after the international	invention "X" document of particular relevance; the c		
"L" docume	ent which may throw doubts on priority claim(s) or	cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
citatio	is cited to establish the publication date of another in or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the c cannot be considered to involve an involve a	rentive step when the	
	ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or means	document is combined with one or mo ments, such combination being obvious	ire other such docu- is to a person skilled	
	ent published prior to the international filing date but han the priority date claimed	in the art. "&" document member of the same patent	lamily	
Date of the	actual completion of the international search	Date of mailing of the international sea	arch report	
9	February 2000	17/02/2000		
Name and	mailing address of the ISA	Authorized officer		
}	European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk			
	Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Diederen, J		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Inal Application No PCT/EP 99/08056

.,, 00	ntion) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
ategory :	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	GLOWACKI, J. ET AL.: "Demineralized Bone Implants" CLINICS PLASTIC SURGERY, vol. 12, no. 2, April 1985 (1985-04), pages 233-241, XP000874409 page 235, column 2, line 18 -page 236, column 2, line 9	
	·	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter onal Application No PCT/EP 99/08056

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5112354	Α	12-05-1992	NONE		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
WO 9639203	A	12-12-1996	AU	6107496 A	24-12-1996
			CA	2222626 A	12-12-1996
			CN	1192700 A	09-09-1998
			ΕP	0851772 A	08-07-1998
US 4472840	 А	25-09-1984	US	4394370 A	19-07-1983

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP 99/08056

A. KLASSI IPK 7	ifizierung des anmeldungsgegenstandes A61L27/36		
Nach der in	nternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Kla	assifikation und der IPK	
B. RECHE	RCHIERTE GEBIETE		
Recherchies IPK 7	rter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymb A61L	iole)	
	rte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, so		
	er internationalen Recherche konsultierte elektronische Dalenbank (N	Name der Datenbank und evtl. verwendete :	Suchbegriffe)
C. ALS WE	ESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		·
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angab	oe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
х	US 5 112 354 A (SIRES BRYAN S) 12. Mai 1992 (1992-05-12)		1-5,9
Υ	Spalte 1, Zeile 30 - Zeile 48 Spalte 5, Zeile 34 -Spalte 6, Zei	ile 55	6-8
Υ	WO 96 39203 A (BIOCOLL LAB INC) 12. Dezember 1996 (1996-12-12) Seite 1, Zeile 17 - Zeile 31 Seite 23, Zeile 32 -Seite 24, Zei	ile 6	6
Υ	US 4 472 840 A (JEFFERIES STEVEN 25. September 1984 (1984-09-25) Spalte 2, Zeile 38 - Zeile 68 Beispiel 1	R)	7,8
·	-	-/	
	ere Veröffentlichungen sind der Fortselzung von Feld C zu ehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie	
"A" Veröffer aber ni "E" älteres [S Anmele "L" Veröffer schein andere soll od ausgef "O" Veröffer eine Bü-	ntlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er- sen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer en im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden ter die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie führt) ntlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, ierudzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen be zieht mitlichung die vor dem intermationsalen Anmelderfaltum, aber nach	T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht Anmeldung nicht kollkilert, sondem nur Erfindung zugrundellegenden Prinzips cheiden von besonderer Bedeut kann allein aufgrund dieser Veröffentlicher Tätigkeit beruhend betrat "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeut kann nicht als auf erfinderischer Tätigke werden, wenn die Veröffentlichung mit Veröffentlichungen dieser Kategorie in Veröffentlichung über Kategorie in Veröffentlichung über Fachmann : "8" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Absendedatum des internationalen Rec	worden ist und mit der zum Verständnis des der oder der ihr zugrundeliegenden tung; die beanspruchte Erfindung hung nicht als neu oder auf chtet werden tung; die beanspruchte Erfindung eit beruhend betrachtet einer oder mehreren anderen Verbindung gebracht wird und nahellegend ist Patentfamilie ist
9	. Februar 2000	17/02/2000	
Name und P	Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.	Bevollmächtigter Bediensteter	
	Fay: (+31-70) 340-3016	Diederen, J	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte onales Aktenzeichen
PCT/EP 99/08056

	ING) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Categorie ·	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweil erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
	GLOWACKI, J. ET AL.: "Demineralized Bone Implants" CLINICS PLASTIC SURGERY, Bd. 12, Nr. 2, April 1985 (1985-04), Seiten 233-241, XP000874409 Seite 235, Spalte 2, Zeile 18 -Seite 236, Spalte 2, Zeile 9	
,		
		-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichur wen, die zur seiben Patentfamilie gehören

Intel Inales Aktenzeichen
PCT/EP 99/08056

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5112354	Α	12-05-1992	KEIN	Ε	
WO 9639203	A	12-12-1996	AU CA CN EP	6107496 A 2222626 A 1192700 A 0851772 A	24-12-1996 12-12-1996 09-09-1998 08-07-1998
US 4472840	Α	25-09-1984	US	4394370 A	19-07-1983